

Guilherme da Silva de Medeiros

**AVALIAÇÃO DE MARCADORES DE ESTRESSE  
OXIDATIVO E DOS ÍNDICES DE DANO AO DNA EM  
AMOSTRAS DE SANGUE PERIFÉRICO DE CRIANÇAS  
COM DOENÇA CELÍACA**

Trabalho de Conclusão de  
Curso submetido ao Centro de  
Ciências Biológicas da  
Universidade Federal de Santa  
Catarina para a obtenção do  
Grau de Bacharel em Ciências  
Biológicas.

Orientador: Dr. Sharbel  
Weidner Maluf

Florianópolis

2014

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Medeiros, Guilherme da Silva de  
Avaliação de marcadores de estresse oxidativo e dos  
índices de dano ao DNA em amostras de sangue periférico de  
crianças com doença celíaca / Guilherme da Silva de Medeiros  
; orientador, Sharbel Weidner Maluf - Florianópolis, SC,  
2014.  
56 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -  
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências  
Biológicas. Graduação em Ciências Biológicas.

Inclui referências

1. Ciências Biológicas. 2. Doença Celíaca. 3. Estresse  
Oxidativo. 4. Enzimas Antioxidantes. 5. Danos Oxidativos.  
I. Maluf, Sharbel Weidner. II. Universidade Federal de  
Santa Catarina. Graduação em Ciências Biológicas. III. Título.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente eu devo os meus agradecimentos à minha família, que me incentivou a estudar desde pequeno, sempre apoiando as minhas decisões e nunca me desestimulando quanto à carreira que escolhi seguir. Além disso, sempre me apoiaram financeiramente, permitindo que eu me dedicasse exclusivamente à minha formação e à obtenção deste título acadêmico.

Meu segundo agradecimento vai para a minha namorada, Daiane, que nos últimos meses (e principalmente nas últimas semanas) tem conseguido me aguentar falando do TCC todo dia o dia inteiro, me acalmando e, pelo menos, tentando me tranquilizar quando o nervosismo batia e quando os prazos – e o desespero – chegavam.

Agradeço ao pessoal do meu antigo laboratório, em especial o Bene, que me ensinou quase tudo o que eu sei sobre estresse oxidativo e que sempre esteve disposto a me ajudar quando eu precisei. Agradeço também à minha amiga Alessandra (Lala), que lá em um tempo distante, quando estávamos na terceira fase do curso, me abriu as portas deste laboratório após uma conversa durante uma aula de botânica em uma quarta-feira de manhã.

A todo o pessoal do *Solmos!*, que proporcionou muitas risadas e muitos bons momentos ao longo destes anos da

graduação. Também ao Nestor e ao Goiano pelas sinucas no Midnight, ao Alexandre, Léo, Victor, Airton, May e todos os outros amigos e amigas que fizeram parte da minha vida na Graduação e que eu precisaria de muitas páginas para citar o nome de todos eles.

Aos amigos de antes da Universidade, em especial o Heitor, o Gabriel, o Cris, a Yasmim, a Thaís, o Hiago, o Emídio e todo o pessoal da *Turma do Cantinho*, que desde o terceirão estão comigo e, mesmo que a universidade tenha nos feito seguir por caminhos diferentes, a amizade continua.

Por fim, agradeço ao meu atual orientador, que me deu a oportunidade de desenvolver um bom trabalho, além de ter me proporcionado a vivência em um laboratório de análise clínica do HU e um amplo conhecimento sobre citogenética e suas técnicas.

À UFSC, local onde fiz toda a graduação e onde desenvolvi todos os meus trabalhos, e também às agências de fomento à pesquisa e ao HU, que em conjunto com deram a mim suporte financeiro, sem o qual eu provavelmente não teria conseguido chegar aqui.

*“Toda a nossa ciência, comparada com a realidade, é primitiva e infantil – e, no entanto, é a coisa mais preciosa que temos”.*

~Albert Einstein



## RESUMO

A Doença Celíaca é uma doença hereditária que afeta aproximadamente 1% da população. Ela é causada pelo contato entre glúten ingerido na alimentação e o intestino de pessoas pré-dispostas que possuem sensibilidade à gliadina, um componente do glúten. Este contato causa uma reação autoimune no indivíduo que leva a uma inflamação crônica do intestino, causando má absorção de nutrientes e mudança na morfologia das vilosidades intestinais. O presente trabalho verificou que, há um quadro de estresse oxidativo sistêmico relacionado à Doença Celíaca. Foram analisadas as atividades de três enzimas que fazem parte da cadeia antioxidante celular, sendo elas a Catalase, a Glutathione Peroxidase e a Superóxido Dismutase. Também foi analisado o nível de lipoperoxidação tecidual através do método que analisa substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico, além dos índices de quebras de fita simples, quebras de fita dupla e de alterações estruturais sensíveis ao pH alcalino das fitas de DNA através da técnica Cometa. Houve diferença significativa entre os grupos na atividade da Catalase ( $p=0,011$ ), na atividade da Superóxido Dismutase ( $p=0,013$ ) e no índice de dano ao DNA ( $p=0,023$ ). Os níveis de estresse oxidativo encontrados podem ter relação com o aumento significativo nos níveis de danos ao DNA, o que pode indicar um papel deste desequilíbrio no aparecimento de doenças secundárias a doença celíaca, assim

como o câncer. A utilização de antioxidantes como um complemento à retirada do glúten da dieta deve ser testada em estudos posteriores.

**Palavras chave:** Doença Celíaca, Estresse Oxidativo, Enzimas Antioxidantes Celulares, Técnica do Cometa.



## **ABSTRACT**

Celiac Disease is a heritage disease caused by ingestion of gluten by people who have sensibility to gliadin, a component of gluten. This disease affects 1% of population, and is characterized by a chronic inflammation of small intestine. It causes bad absorption of nutrients and changes in morphology of intestinal villi. This study confirmed a systemic set of oxidative stress in the patients group. Three enzymes were analyzed: Catalase, Glutathione Peroxidase and Superoxide Dismutase. We also analyzed tissue levels of lipid peroxidation by the method which analyzes substances that react with Thiobarbituric Acid, and the levels of single and double strand breaks and sensitive structural changes to alkaline pH in the DNA structure, through Comet Assay technique. We found significant difference between groups in the Catalase activity ( $p=0,011$ ), Superoxide Dismutase ( $p=0,013$ ) and DNA damage ( $p=0,023$ ). The levels of oxidative stress were sufficient to induce a significant increase in the levels of DNA damage, confirming the role of this imbalance in the emergence of secondary diseases in celiac patients, as well as cancer. The use of antioxidants as a supplement to the withdrawal of gluten from the diet should be tested in future studies.

**Key words:** Celiac Disease, Oxidative Stress, Antioxidants Enzymes, Comet assay.



## **LISTA DE FIGURAS**

Figura 1 – Atividade enzimática da Catalase.....	34
Figura 2 – Atividade enzimática da SOD.....	35
Figura 3 – Atividade enzimática da Glutathione Peroxidase.....	36
Figura 4 – Medida das substâncias que reagem com o Ácido Tiobarbitúrico.....	36
Figura 5 – Índice de dano medido em 100 células por indivíduo.....	37

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1. Marcadores de estresse oxidativos e de dano de DNA em pacientes com doença celíaca e controles.....	33
---	----



## LISTA DE ABREVIATURAS

CAT – Catalase;

CCB – Centro de Ciências Biológicas;

DC – Doença Celíaca;

DNA – Ácido Desoxirribonucleico;

EDTA – Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético;

ERNs - Espécies Reativas de Nitrogênio;

EROs - Espécies Reativas de Oxigênio;

GPx - Glutathione Peroxidase;

GSH – Glutathione Reduzida;

GSSG – Glutathione Oxidada;

H<sub>2</sub>O – Água;

O<sub>2</sub> – Oxigênio Molecular;

O<sub>2</sub><sup>-</sup> - Radical Superóxido;

OH<sup>-</sup> - Radical Hidroxila;

RNA – Ácido Ribonucleico;

SOD - Superóxido Dismutase;

TBA – Ácido Tiobarbitúrico;

TBARS – Substâncias que Reagem com o Ácido Tiobarbitúrico;

TCA – Ácido Tricloroacético;

TRIS – Tris-Hidroximetil Aminometano;

UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina;



## **SUMÁRIO**

1 - INTRODUÇÃO.....	17
2 - OBJETIVOS.....	21
3 - METODOLOGIA.....	24
3.1 – Cometa.....	26
3.2 – TBARS.....	28
3.3 – Catalase.....	29
3.4 – Glutathione Peroxidase.....	30
3.5 – Superóxido Dismutase.....	30
3.6 – Cálculos Estatísticos.....	32
4 – RESULTADOS.....	33
5 - DISCUSSÃO.....	38
6 - CONCLUSÕES.....	45
7 - REFERÊNCIAS.....	47
APÊNDICES.....	51





## 1.INTRODUÇÃO

A Doença Celíaca é um mal que acomete aproximadamente 1% da população mundial. É uma doença que se caracteriza por uma inflamação crônica da mucosa do intestino delgado, causada pela reação do sistema imune ao glúten ingerido na alimentação. Com a inflamação, pode-se observar uma mudança visível nas vilosidades intestinais, com atrofia destas e consequente má absorção de nutrientes pelo indivíduo (Green e Jabri, 2003; Dube *et al.*, 2005).

O Glúten é uma mistura de duas proteínas (gliadina e glutenina) presente no trigo, na cevada, no centeio e na aveia. A gliadina, presente em sua composição, é a responsável pela reação característica da doença. A gliadina é uma proteína que pode, quando em contato com a mucosa intestinal de pessoas predispostas, ativar a imunidade inata local (Schuppan *et al.*, 2003), causando a liberação de citocinas e resposta inflamatória, além de ativar a imunidade adaptativa do indivíduo, com a produção de anticorpos. Durante a inflamação, a presença da enzima transglutaminase tecidual deamida a gliadina, aumentando a presença de sítios reativos no meio e assim ativando ainda mais a imunidade inata e a imunidade adaptativa do indivíduo. A gliadina é reconhecida por células CD4 T<sub>helper</sub> da lâmina própria e inicia assim o processo de resposta

imune adaptativa, envolvendo a produção de anticorpos e a mudança morfológica observada na doença (Schuppan, 2000). Esta doença possui uma forte influência genética, e dois genes possuem forte relação com esta resposta imune: o HLA-DQ2 e o HLA-DQ8. Estes genes estão presentes em 95% dos pacientes e podem ajudar no diagnóstico através da genotipagem do indivíduo.

Além da conhecida resposta imune que o glúten pode provocar às pessoas com doença celíaca, ele ainda pode causar danos por meio de reações que resultam em um elevado estresse oxidativo nestas pessoas. Alguns peptídeos da gliadina, mais especificamente os P31-43, possuem a habilidade de entrar nas células. Lá eles são acumulados em lisossomos e proporcionam uma grande produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (Heyman *et al.*, 2009; Zimmer *et al.*, 2010). Acredita-se que o estresse oxidativo gerado deste modo seja o responsável por uma parte de toda a citotoxicidade encontrada na doença, sendo ele o responsável por alterações morfológicas, por danos na proliferação celular e até por reações de apoptose (Elli *et al.*, 2003; Di Sabatino *et al.*, 2001).

A produção de espécies reativas de Oxigênio (EROs) e de Nitrogênio (ERNs) é um processo natural nos seres vivos, e possui grande importância biológica, como o

auxílio na defesa do indivíduo contra a invasão de microorganismos potencialmente patogênicos, em que as espécies reativas são utilizadas durante a fagocitose para eliminar o agente invasor. Por outro lado, a produção excessiva de espécies reativas pode ser danosa ao organismo. Sendo assim, o organismo possui um vasto e eficiente sistema a fim de controlar esta superprodução e reestabelecer o equilíbrio. Alguns agentes deste sistema são as enzimas antioxidantes, como a Catalase (CAT), a Superóxido Dismutase (SOD) e a Glutathione Peroxidase (GPx), que reagem com os compostos oxidantes e protegem as células e os tecidos do estresse oxidativo (Halliwell & Gutteridge, 2006). O cenário em que há um desequilíbrio entre as moléculas pró e antioxidantes, com uma predominância das primeiras e em decorrência disto a produção de danos celulares, é chamado Estresse Oxidativo (Sies, 1985; Vasconcelos *et al.*, 2007).

Espécies Reativas de Oxigênio são moléculas, geralmente derivadas do  $O_2$ , que possuem um elétron desemparelhado na sua última camada de valência, tornando essas moléculas altamente reativas, pois o número ímpar de elétrons na última camada de valência torna a molécula altamente instável. Entre as EROs conhecidas, podemos citar o Radical Superóxido ( $O_2^-$ ), que por uma reação de redução

recebeu um elétron; o radical Hidroperoxila ( $\text{HO}_2^*$ ), que é a forma protonada do radical Superóxido e é mais reativo do que o mesmo; e o radical Hidroxila ( $\text{OH}^*$ ), que é o mais reativo radical conhecido e altamente danoso à estrutura e maquinaria celular (Ferreira *et al.*, 1997).

O correto controle dos níveis das enzimas antioxidantes nas células é essencial para a sobrevivência do indivíduo. No presente estudo foram avaliadas três enzimas que fazem parte da cadeia antioxidante: a Superóxido Dismutase, que converte os radicais superóxidos em peróxido de hidrogênio, e as enzimas Catalase e Glutathione Peroxidase, que de forma independente entre si convertem o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio. É muito importante o equilíbrio entre estas três enzimas, pois o peróxido de hidrogênio é capaz de reagir com metais de transição (os mais importantes no nosso caso é  $\text{Cu}^{+1}$  e o  $\text{Fe}^{+2}$ , pela sua biodisponibilidade elevada) e formar o radical hidroxila ( $\text{OH}^*$ ), que é o radical mais reativo produzido e que ataca as mais diversas moléculas celulares (DNA, RNA, proteínas, lipídios), podendo em um longo período de tempo causar o aparecimento de câncer e outras desordens à saúde (Barreiros *et al.*, 2006).

Este estudo baseia-se em investigar se os efeitos pró-oxidantes que a gliadina exerce no intestino delgado dos

pacientes portadores de doença celíaca também se manifestam em nível sistêmico, e se este estresse oxidativo resulta no aumento nos índices de dano ao DNA e no aumento de dano ao tecido lipídico.

## **2.OBJETIVOS**

### **2.1-Objetivo Geral**

- Avaliar a atividade de enzimas antioxidantes, o nível de lipoperoxidação e os índices de dano de DNA no sangue periférico de crianças com Doença Celíaca.

### **2.2-Objetivos específicos**

- Analisar a atividade de três enzimas que pertencem à cadeia antioxidante celular: Catalase, Superóxido Dismutase e Glutathione Peroxidase a partir de sangue periférico coletado de crianças com doença celíaca;

- Analisar o nível de lipoperoxidação tecidual através da técnica TBARS a partir do plasma de crianças com Doença Celíaca;

- Analisar os índices de quebras de fita simples, quebras de fita dupla e de alterações estruturais sensíveis ao pH alcalino, das fitas de DNA, através da técnica Cometa em leucócitos do sangue periférico de crianças com doença celíaca.

-Relacionar os dados obtidos com o conhecimento existente sobre a doença celíaca e discutir a possibilidade da

utilização de medidas que atenuem os efeitos secundários à inflamação em pacientes com doença celíaca.

### **3.METODOLOGIA**

O primeiro contato com os pacientes foi obtido a partir da *Associação dos Celíacos de Santa Catarina* (ACELBRA-SC), uma associação voltada para o apoio às pessoas com Doença Celíaca que promove a divulgação do conhecimento científico acerca deste tema, dicas e orientações às pessoas além de prestar apoio às pesquisas na área e atuar como um agente facilitador entre pesquisador, equipes médicas e indivíduos celíacos. O número inicial de crianças que tiveram a coleta de sangue realizada foi de 54, sendo que 7 destes indivíduos não tiveram o diagnóstico confirmado posteriormente, sendo assim excluídos do estudo e deixando a amostra final com 47 pacientes na faixa etária de 3 a 13 anos. O diagnóstico final foi dado pelo médico gastroenterologista de cada indivíduo, para o qual foram considerados os exames imunológicos e a análise da morfologia das vilosidades intestinais de tecido retirado em biópsia e a confrontação destas observações com o histórico clínico do paciente. Como grupo controle, foram analisadas 31 amostras de sangue periférico de crianças saudáveis, encaminhadas ao Serviço de Coleta do Hospital Infantil Joana de Gusmão para exames de periódicos de rotina. Não há registros de outras doenças crônicas ou da ingestão de medicamentos que possam de alguma forma afetar os



resultados da pesquisa em nenhuma das crianças tanto do grupo DC como do grupo Controle..

O presente estudo faz parte de um trabalho maior coordenado pelo Dr. Sharbel Weidner Maluf, e foi devidamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEPSH) da UFSC sob número do processo 2198 e pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Infantil Joana de Gusmão sob o parecer 008-2012.

As coletas de sangue foram realizadas no período de 6 meses, através de punção intravenosa, nas quais foram coletados 2 ml de sangue em tubo heparinizado para utilização na avaliação do dano ao DNA através da técnica Cometa, e 4ml de sangue em tubo com EDTA para análises moleculares enzimáticas (CAT, SOD e GPx) e para a obtenção do plasma utilizado na análise da liporeoxidação tecidual (TBARS). A técnica Cometa foi realizada no Laboratório de Neurogenética do Desenvolvimento, que está alocado no terceiro andar do bloco B da ala nova do CCB, e está vinculado ao Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética da UFSC, enquanto que as demais análises moleculares foram realizadas no Laboratório de Ecofisiologia Respiratória, que está alocado no primeiro andar do bloco C da ala nova do CCB, e está vinculado ao

Departamento de Ecologia e Zoologia do Centro de Ciências Biológicas da UFSC.

Para as técnicas moleculares, inicialmente foi colhido 4ml de sangue em tubo com EDTA. Logo após foi realizada uma centrifugação (4500g durante 10 minutos) para a obtenção do plasma e dos eritrócitos. O plasma foi retirado e armazenado em nitrogênio líquido (-170°C) para posterior utilização na técnica do TBARS, enquanto os eritrócitos foram submetidos a duas lavagens em solução salina, com uma centrifugação após cada lavagem (4500g por 5 minutos) e sofrendo posterior lise por sucessivos congelamentos e descongelamentos. Após a lise houve uma centrifugação final (5000g por 5min) onde foi obtido o sobrenadante do lisado para as posteriores análises realizadas de CAT, SOD e GPx.

### **3.1 - COMETA**

O protocolo utilizado para esta técnica foi inicialmente descrito por Singh (Nadin *et al.*, 2001; Singh, *et*

*al.*, 1988) e adaptado posteriormente para amostras *in vivo* (Tice *et al.*, 2000; Hartmann *et al.*, 2003).

A técnica se inicia misturando 5µl de sangue e 95µl de agarose com baixo ponto de fusão (*low melting*) em um microtubo para centrifugação. Depois, pipeta-se a mistura em uma lâmina previamente preparada com uma cobertura de agarose, cobre-se a mesma com uma lamínula e deixa-se secar em geladeira dentro de uma câmara úmida por 10 minutos. Após a solidificação da agarose *low melting*, retira-se cuidadosamente a lamínula e coloca-se a lâmina em uma solução de lise, que irá ficar em geladeira por 1-7 dias. Após este tempo, as lâminas são retiradas da solução, colocadas em cuba de eletroforese e imersas a uma solução alcalina durante 20 minutos, tempo necessário para ocorrer o desenovelamento das fitas de DNA e consequente exposição dos sítios alcali-lábeis e das quebras de fita única e dupla fita. As amostras então são submetidas à eletroforese (25 V; 300 mA; 0.9 V/cm) durante 20 minutos. Então, são feitas 3 lavagens em solução neutralizadora e 3 lavagens em água destilada e secadas à temperatura ambiente. É importante ressaltar que todos os processos, até a eletroforese, são realizados sem exposição das células à luz branca, o que poderia causar um aumento na quantidade de lesões na estrutura do DNA.

Continuando, as lâminas são fixadas e coradas com coloração de prata, como demonstrado em Nadin *et al.* (2001). Para a avaliação do dano, foram analisadas 100 células por indivíduo, observadas sob aumento de 200x em microscópio óptico. As células foram classificadas de 0 (sem dano) a 4 (dano máximo), de acordo com o formato e tamanho da cauda. O somatório total (índice de dano) para 100 células é de 0 a 400 (Hartmann *et al.*, 2003)

### **3.2 - LIPOPEROXIDAÇÃO TECIDUAL (TBARS)**

Para esta análise, utilizou-se o método descrito por Ohkawa *et al.* (1979). A peroxidação lipídica do tecido permite o aparecimento de substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico (principalmente o malondialdeído).

Inicialmente misturou-se 1ml de Ácido Tricloroacético (TCA) e 100 µl de plasma e agitou-se em um agitador de tubos. Depois foi adicionado 900µl de tampão TRIS, 1ml de Ácido Tiobarbitúrico (TBA) e agitou-se novamente o tubo em um mixer. Depois, os tubos foram fervidos a 100°C em banho-maria durante uma hora. Nesta etapa ocorre a reação entre o TBA e os produtos da lipoperoxidação, formando uma base de Schiff de coloração rosa (Bird & Draper, 1984). Para o preparo do “branco”

(usado para descontar a absorbância normal dos reagentes) utilizou-se os mesmos volumes acima mencionados, mas ao invés de amostra utilizou-se água destilada, além deste não ter sido fervido.

Após a fervura das amostras centrifugou-se tudo a 4500g durante 3 minutos e retirou-se 200µl de sobrenadante, sendo este utilizado para a leitura espectrofotométrica em um comprimento de onda de 535nm. Após o desconto do branco os valores foram expressos em nmol.mL<sup>-1</sup>.

### **3.3 - CATALASE (CAT)**

Utilizou-se o método descrito por Aebi (1984). O método consiste na quantificação da velocidade da decomposição do peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) pela enzima presente na amostra em uma solução medida espectrofotometricamente durante 20 segundos a 240nm, pois é neste comprimento de onda que o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tem máxima absorbância. Para a realização do ensaio utilizou-se uma solução de peróxido de hidrogênio 10 mM em tampão fosfato 50 mM com pH 7,0. Misturou-se 20 µl de amostra em 2ml de solução e imediatamente iniciou-se a leitura. O

valor de atividade enzimática obtido se dá em  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ ml}^{-1}$ .

### **3.4 - GLUTATIONA PEROXIDASE (GPx)**

O método utilizado foi o descrito por Guntzler e Flohe (1984), e se utiliza da medição espectrofotométrica a 340nm da medida de oxidação de NADPH por glutatona redutase. A GPx catalisa a redução de peróxido de hidrogênio e outros peróxidos, utilizando a Glutationa Reduzida (GSH) como substrato, produzindo Glutationa Oxidada (GSSG). O ensaio se baseia no decréscimo de absorvância promovido durante a redução da GSSG em GSH, catalisada pela Glutationa Redutase. A velocidade de oxidação do NADPH é proporcional à velocidade de produção de GSSG a partir de GSH na presença de terc-butil hidroperóxido (t-BuOOH), o que é catalisada pela GPx. Os valores são expressos em  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ ml}^{-1}$ .

### **3.5 - SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD)**

O método utilizado foi o descrito em 1972 por Misra e Fridovich, e modificado em 1983 por Boveris *et al.*. De

forma espectrofotométrica, utiliza-se a oxidação da adrenalina, que ocorre devido à uma mudança de pH (de 2,0 para 10,0) e forma o ânion superóxido ( $O_2^-$ ) e o adenocromo, que possui coloração rosa. Esta transformação é retardada pela enzima presente na amostra. Previamente a amostra deve ser lavada com uma solução de clorofórmio:etanol (proporção de 3:5) para eliminar a interferência da hemoglobina no ensaio, que pode gerar ânion superóxido e comprometer a correta análise enzimática. A leitura é feita no comprimento de onda de 480 nm.

A reta padrão da análise é formada através da adição de crescentes volumes de amostra (10, 20 e 30  $\mu$ l) em uma solução contendo 1,95ml de solução tampão e 50  $\mu$ l de solução de adrenalina. Após os ensaios, analisou-se qual a quantidade de adrenalina não foi oxidada (utilizando-se os valores obtidos da atividade dos diversos volumes de amostra utilizados anteriormente) e determinou-se através de cálculo qual concentração de SOD foi necessária para inibir 50% da oxidação da adrenalina, pois a atividade enzimática da SOD se define em “U SOD  $ml^{-1}$ ”, sendo uma unidade de SOD definida como a concentração necessária de SOD para diminuir à metade a velocidade de formação de adenocromo (Misra & Fridovich, 1972).

### **3.6 – CÁLCULOS ESTATÍSTICOS**

Para todos os resultados foi utilizado o Teste U de Mann-Whitney e o programa IBM SPSS Statistics 18.0. O teste U de Mann-Whitney é um teste não paramétrico utilizado para amostras independentes, e que indica se há ou não diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) entre os dois grupos de amostras (neste caso, o grupo DC e o grupo Controle). Por não utilizar o pareamento dos resultados para realizar o cálculo, há uma maior liberdade em relação ao número de amostras por grupo, permitindo a comparação de grupos com números de amostras diferentes.



## 4.RESULTADOS

A compilação dos dados obtidos se encontra na tabela 1. Nela podemos observar a média dos resultados referentes a cada teste, além do desvio padrão obtido e do número de amostras utilizada em cada grupo. Podemos ver também se há ou não diferença estatística significativa entre os grupos estudados. Cabe notar que o “n” utilizado é diferente entre as diversas técnicas no grupo DC, e isto é justificado pelo fato de algumas amostras não terem produzido resultados em todos os testes durante os procedimentos laboratoriais.

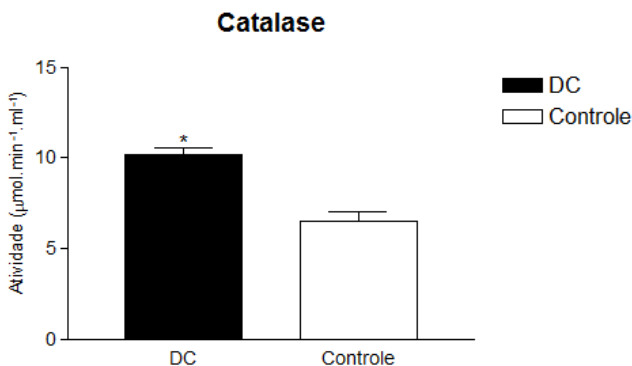
Tabela 1. Marcadores de estresse oxidativos e de dano de DNA em pacientes com doença celíaca e controles.

	<b>Doença Celíaca</b>	<b>Controles</b>	<b>P</b>
<b>TBARS</b>	0,060±0,059 (n=47)	0,0433±0,0432 (n=31)	NS
<b>CAT</b>	10,17±2,79 (n=45)	6,48± 2,38(n=20)	=0,011
<b>SOD</b>	74,34± 22,23(n=47)	58,23± 23,29(n=20)	=0,013
<b>GPx</b>	50,23± 8,98(n=42)	53,13±17,74 (n=20)	NS
<b>Cometa</b>	20,57± 10,59(n=44)	11,36± 6,42(n=20)	=0,023

Média ± desvio padrão. TBARS: Medida das Substâncias que Reagem ao Ácido Tiobarbitúrico; CAT: Avaliação da atividade da Catalase; SOD: Atividade da Superóxido Dismutase; GPx: Atividade da Glutathione Peroxidase; Cometa: Índice de dano medido em 100 células por indivíduo. P: nível de significância; NS: estatisticamente não significativo.

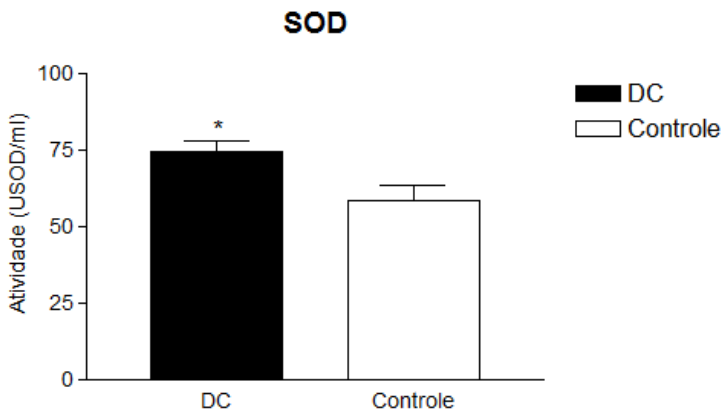
Para a atividade enzimática da Catalase (figura 1) encontrou-se diferença estatística significativa entre o grupo controle e os pacientes do estudo ( $p<0,05$ ), sendo que a atividade encontrada no grupo dos pacientes foi maior do que a atividade encontrada no grupo controle.

**Figura 1:** Atividade enzimática da Catalase ( $*p<0,05$ ) em crianças portadoras de doença celíaca (DC) e em crianças normais (Controle)



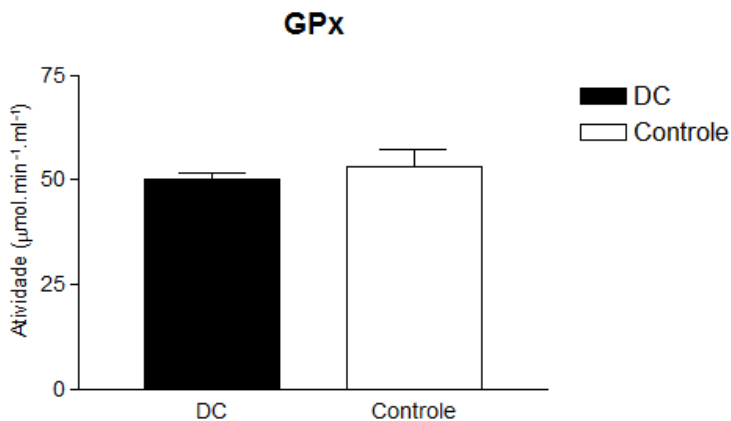
Também encontrou-se diferença estatística significativa ( $p<0,05$ ) entre os dois grupos para a atividade da enzima Superóxido Dismutase (figura 2), novamente com o aumento da atividade no grupo de estudo, quando comparado ao grupo controle.

**Figura 2:** Atividade enzimática da SOD (\* $p < 0,05$ ) em crianças portadoras de doença celíaca (DC) e em crianças normais (Controle)

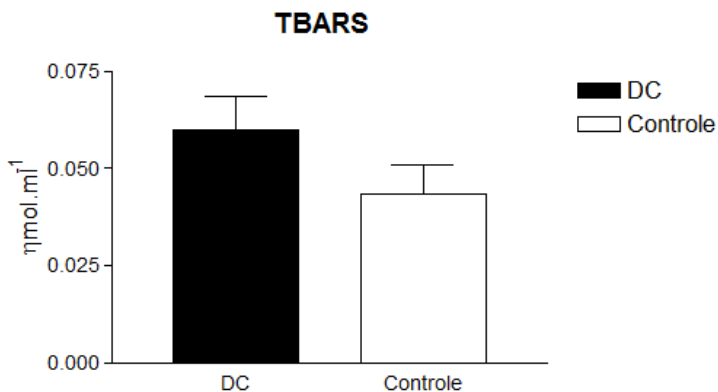


A atividade enzimática da GPx (figura 3) e a medida das Substâncias que Reagem com o Acido Tiobarbitúrico (TBARS – figura 4) não obtiveram diferenças estatísticas significativas entre os dois grupos ( $p > 0,05$ ).

**Figura 3:** Atividade enzimática da Glutathione Peroxidase (GPx) em crianças portadoras de doença celíaca (DC) e em crianças normais (Controle). Não houve diferença estatística significativa entre os dois grupos ( $p>0,05$ ).

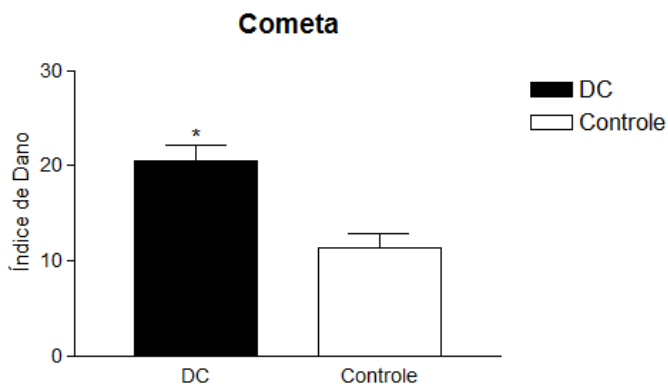


**Figura 4:** Medida das substâncias que reagem com o Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) em crianças portadoras de doença celíaca (DC) e em crianças normais (Controle). Não houve diferença estatística significativa encontrada entre os grupos ( $p>0,05$ ).



Para a técnica Cometa, que mede o índice de dano ao DNA, houve diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) entre os grupos, com uma maior prevalência de dano no grupo de pacientes do estudo, quando comparado ao grupo controle (figura 5).

**Figura 5:** Índice de dano medido em 100 células por indivíduo ( $*p < 0,05$ ) em crianças portadoras de doença celíaca (DC) e em crianças normais (Controle).



## 5.DISCUSSÃO

O comportamento molecular esperado se confirmou parcialmente neste estudo. Segundo Ferreti *et al.* (2012), em um artigo de revisão em que foram compilados resultados de diversos estudos, existem evidências de um cenário de estresse oxidativo associado à Doença Celíaca. Comparando os resultados encontrados por Ferreti *et al.* (2012) e os testes realizados no presente estudo, esperava-se um aumento na atividade da SOD, um decréscimo da atividade da GPx e um aumento do nível de Lipoperoxidação Tecidual no grupo dos pacientes celíacos.

Observamos um aumento da atividade da SOD, porém a atividade da GPx e o nível de lipoperoxidação tecidual não mostraram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. Por outro lado, o nível de atividade da Catalase foi significativamente maior no grupo de crianças com a doença. Para analisar o que estes resultados e a bibliografia têm a nos dizer, cabe aqui recordar a interação que ocorre entre as enzimas citadas: inicialmente a SOD produz  $H_2O_2$  a partir de radicais superóxidos ( $O_2^-$ ) que poderiam danificar os componentes celulares. Porém, o  $H_2O_2$  é capaz de formar o radical hidroxila ( $OH^\cdot$ ), que é ainda mais danoso que o radical superóxido. Então as enzimas Catalase e Glutathione

Peroxidase, de forma independente entre si, convertem o  $H_2O_2$  em  $H_2O$  e  $O_2$ . É bem documentado que em situações de elevado estresse e elevada produção de radicais as enzimas antioxidantes elevam a sua atividade em uma tentativa de conter esta superprodução e minimizar os danos decorrentes desta condição. O aumento da atividade da SOD é compatível com uma resposta ao cenário de estresse a que o corpo do indivíduo está submetido na Doença Celíaca, em que há a inflamação crônica do intestino e todos os problemas que incorrem a partir da doença.

À primeira vista pode parecer contraditório que na literatura encontremos a atividade da GPx diminuída nos indivíduos com Doença Celíaca, uma vez que a sua atividade deveria aumentar em resposta ao aumento da atividade da SOD e o consequente aumento na produção de  $H_2O_2$ . Porém, esta diminuição na atividade da GPx pode ser explicada por um concomitante aumento na atividade da Catalase, encontrado no nosso estudo. Visto que as duas enzimas ocupam a mesma posição na cadeia antioxidante celular, o aumento observado da atividade da Catalase pode ser usado para justificar a diminuição da atividade da GPx.

Embora o presente estudo não tenha encontrado diferença significativa entre o nível de lipoperoxidação tecidual do grupo controle e do grupo DC, encontramos na

literatura estudos que mostram diferença entre estes dois grupos, os quais creditam esta situação a um ambiente de estresse oxidativo elevado, pois o aumento na atividade enzimática antioxidante não é suficiente para neutralizar todos os radicais extras formados pela condição da Doença Celíaca. Esta suposição pode ser testada aumentando o número de crianças no estudo e verificando novamente se há diferença entre os grupos.

As análises da técnica do cometa evidenciaram níveis elevados de danos ao DNA nos pacientes com doença celíaca, quando comparados aos controles. As alterações observadas com a técnica do cometa são passíveis de reparo, ou seja, a técnica avalia os níveis de genotoxicidade e não de mutagênese no tecido estudado. Esse fato torna a técnica do cometa, uma técnica muito sensível para detecção de exposições e condições de risco. Este aumento pode ser creditado ao estresse oxidativo a que o indivíduo está submetido, visto que os radicais livres têm a capacidade de interagir com as moléculas biológicas, causando danos muitas vezes irreparáveis.

Atualmente, o único tratamento efetivo conhecido para a Doença Celíaca é uma dieta totalmente livre de glúten. Porém, há alimentos que podem ajudar a melhorar, ou pelo menos oferecer uma maior proteção ao intestino



fragilizado, como por exemplo a vitamina C e a vitamina E. Estas vitaminas atuam na defesa antioxidante celular, sendo importantes na dieta normal dos indivíduos, mas podem ter uma ação ainda mais benéfica para os celíacos. Bernardo *et al.* (2011) demonstraram recentemente que a administração de vitamina C em culturas celulares provenientes de biópsias intestinais diminuiu a secreção de alguns mediadores pró-inflamatórios e pró-oxidantes, enquanto que Cook-Mill e McCary (2010) demonstraram os benefícios da vitamina E em pacientes Celíacos. Além destas vitaminas, toda a gama de alimentos que fornecem agentes antioxidantes é recomendada, como os alimentos que contém carotenóides, flavonóides e ômega-3. É conhecido que estes alimentos podem fornecer uma barreira protetora ao intestino, diminuindo o efeito danoso do glúten, além de terem participação direta ou indireta na modulação do estresse oxidativo, na expressão gênica e na atividade antiinflamatória.

A importância destas avaliações está relacionada com a prevenção de doenças secundárias a doença celíaca, como alguns tipos de câncer. Leslie *et al.* (2012) demonstraram que a incidência de desordens linfoproliferativas (linfomas) é maior na população de indivíduos com doença celíaca do que a média da população

geral. O estudo encontrou resultados que indicam que quanto mais tarde o indivíduo é diagnosticado com doença celíaca e, consequentemente, quanto mais tempo leva para iniciar o tratamento, maior a chance de desenvolvimento de algum linfoma. Indivíduos que tiveram o diagnóstico de doença celíaca realizado após os 50 anos de idade possuem chance muito maior de desenvolver algum linfoma do que os indivíduos que tiveram o diagnóstico realizado mais precocemente, apontou o estudo. Estes resultados podem ser usados para direcionar políticas de saúde pública, por exemplo. A conscientização é muito importante nestes casos, e o indivíduo com doença celíaca, mesmo que tratado, está em um grupo de risco para o aparecimento de câncer, sendo assim recomenda-se aos indivíduos a realização de exames periódicos específicos e monitoramento constante da dieta livre de glúten.

Há ainda outras doenças e problemas que possuem relação com a Doença Celíaca. Guadalini e Assiri (2014), revisando o tema, apontaram diversos problemas associados à doença celíaca, entre eles a Osteoporose, Artrite, Anemia e Infertilidade. A osteoporose está presente em um terço dos pacientes jovens diagnosticados com doença celíaca, e pode estar relacionada às citocinas liberadas mediante a inflamação do intestino. Estas citocinas podem agir nos

ossos fazendo com que a perda de cálcio seja maior do que a sua absorção, causando um grave quadro que pode facilitar fraturas e quebras ósseas, assim como o desenvolvimento de artrite. A Anemia pode estar relacionada com a dificuldade de absorção de nutrientes, devido à mudança morfológica e funcional que ocorre no intestino dos indivíduos com doença celíaca. O quadro de infertilidade é associado principalmente a mulheres portadoras da doença celíaca. Porém, os mecanismos e o motivo da associação entre doença celíaca e infertilidade não é entendida e tampouco explicada atualmente. Mais estudos são necessários a fim de que se conheça melhor os mecanismos presentes nas doenças associadas à doença celíaca, os seus funcionamentos, implicações e medidas profiláticas e/ou mitigatórias para seus efeitos.

No Brasil, desde 2003, é obrigatória a informação do conteúdo de glúten nos rótulos dos alimentos, bem como em materiais de propaganda de alimentos (lei n° 10.674, de 16 de maio de 2003). Esta identificação deve ser feita de forma clara, de fácil observância e não deve deixar dúvidas ao consumidor. Porém, o conhecimento da doença e das suas implicações ainda é muito baixo entre a população em geral. A conscientização das pessoas é um importante passo para diminuir a mortalidade que está associada à DC, visto que a

quantidade de pacientes com doença confirmada vem aumentando muito nos últimos anos, o que nos leva a crer que os números conhecidos a respeito da prevalência de doença celíaca podem estar muito abaixo da real taxa de prevalência de doença celíaca na população em geral.

## **6.CONCLUSÕES**

- Há nos pacientes um quadro de Estresse Oxidativo relacionado à Doença Celíaca, o que deve ser visto com bastante atenção, pois os efeitos conhecidos desse estresse incluem diversas outras doenças que podem afetar os pacientes com DC, como Linfomas, Osteoporose, Anemia e Artrite. A partir dessa análise, pode-se inferir que quanto mais tardio o diagnóstico, maiores as chances de aparecerem outras doenças relacionadas à Doença Celíaca.

- Os níveis de estresse oxidativo encontrados foram suficientes para induzir um aumento significativo nos níveis de danos de DNA avaliados pela técnica do cometa, o que pode influenciar no aparecimento de doenças secundárias à doença celíaca, pois o aumento na frequência de alterações na estrutura do DNA também está relacionado com o aumento na incidência de doenças de desenvolvimento tardio, assim como o câncer.

- A partir dos resultados encontrados por este estudo e dos dados de outros estudos, pode-se inferir a importância do diagnóstico precoce e do tratamento (dieta livre de glúten). O diagnóstico tem sido dificultado pelo fato de que o conhecimento da população sobre a Doença Celíaca é baixo, e a conscientização se faz necessária para aumentar a

percentagem de diagnósticos em relação aos números conhecidos de pessoas afetadas pela Doença Celíaca, que apresenta-se subestimada.

- Mais estudos são necessários a fim de obter mais conhecimento de todas as implicações que a Doença Celíaca pode trazer, bem como deve haver um acompanhamento dos pacientes a fim de analisar se o desequilíbrio oxidativo permanece após o início da dieta livre de glúten.

## 7.REFERÊNCIAS

AEBI, H. **Catalase in vitro**. Methods Enzymol, v. 105, p. 121-6, 1984.

BARREIROS, A.; DAVID, J.; DAVID, J. **Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo**. Quím. Nova, São Paulo , v. 29, n. 1, Feb. 2006

BERNARDO, D. et al. **Ascorbate-dependent decrease of the mucosal immune inflammatory response to gliadin in coeliac disease patients**. Allergol Immunopathol (Madr), v. 40, n. 1, p. 3-8, Jan-Feb 2012.

BIRD, R. P.; DRAPER, H. H. **Comparative studies on different methods of malonaldehyde determination**. Methods Enzymol, v. 105, p. 299-305, 1984.

BOVERIS, A. et al. **Increased chemiluminescence and superoxide production in the liver of chronically ethanol-treated rats**. Arch Biochem Biophys, v. 227, n. 2, p. 534-41, Dec 1983.

COOK-MILLS, J. M.; MCCARY, C. A. **Isoforms of vitamin E differentially regulate inflammation**. Endocr Metab Immune Disord Drug Targets, v. 10, n. 4, p. 348-66, Dec 2010.

DI SABATINO, A. et al. **Intraepithelial and lamina propria lymphocytes show distinct patterns of apoptosis whereas both populations are active in Fas based cytotoxicity in coeliac disease**. Gut, v. 49, n. 3, p. 380-6, Sep 2001.

DUBE, C. et al. **The prevalence of celiac disease in average-risk and at-risk Western European populations:**

**a systematic review.** Gastroenterology, v. 128, n. 4 Suppl 1, p. S57-67, Apr 2005

ELLI, L.; DOLFINI, E.; BARDELLA, M. T. **Gliadin cytotoxicity and in vitro cell cultures.** Toxicol Lett, v. 146, n. 1, p. 1-8, Dec 15 2003.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S.. **Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo.** Rev. Assoc. Med. Bras., São Paulo , v. 43, n. 1, Mar. 1997

FERRETTI, G. et al. **Celiac disease, inflammation and oxidative damage: a nutrigenetic approach.** Nutrients, v. 4, n. 4, p. 243-57, Apr 2012.

GREEN, P. H.; JABRI, B. **Coeliac disease.** Lancet, v. 362, n. 9381, p. 383-91, Aug 2 2003.

GUANDALINI, S.; ASSIRI, A. **Celiac disease: A review.** JAMA Pediatrics, v. 168, n. 3, p. 272-278, 2014.

GUNTZLER, W.; FLOHE, L. **Glutathione peroxidase. In: Handbook of methods for oxygen radical research.** Ed.: R. A. Greenmald. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 1985, pp. 285–290

HALLIWELL, B. & GUTTERIDGE, J.M.C. **Free Radicals in Biology and Medicine.** ed. 4. Oxford: Clarendon Press, 2006

HARTMANN, A. et al. **Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. 4th International Comet Assay Workshop Mutagenesis,** v. 18, n. 1, p. 45-51, Jan 2003.



HEYMAN, M.; MENARD, S. **Pathways of gliadin transport in celiac disease.** Ann N Y Acad Sci, v. 1165, p. 274-8, May 2009.

LESLIE, L. et al. **Incidence of lymphoproliferative disorders in patients with celiac disease.** Am J Hematol, v. 87, n. 8, p. 754-9, Aug 2012.

MISRA, H. P.; FRIDOVICH, I. **The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase.** J Biol Chem, v. 247, n. 10, p. 3170-5, May 25 1972.

NADIN, S. B. et al. **A silver staining method for single-cell gel assay.** J Histochem Cytochem, v. 9, p. 1183-6, 2001

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. **Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction.** Anal Biochem, v. 95, n. 2, p. 351-8, Jun 1979.

SCHUPPAN, D. **Current concepts of celiac disease pathogenesis.** Gastroenterology, v. 119, n. 1, p. 234-42, Jul 2000.

SCHUPPAN, D.; ESSLINGER, B.; DIETERICH, W. **Innate immunity and coeliac disease.** Lancet, v. 362, n. 9377, p. 3-4, Jul 5 2003.

SIES, H. **Oxidative stress: introductory remarks.** In: SIES, H. Oxidative Stress, Ed. Academic press, USA, p. 1-7, 1985

SINGH, N.P. et al. **A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells.** Exp. Cell. Res, v. 175, p. 184-91, 1988

TICE, R. R. et al. **Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing.** Environ Mol Mutagen, v. 35, n. 3, p. 206-21, 2000.

VASCONCELOS, S. M. L. et al. **Espécies Reativas de Oxigênio e de Nitrogênio, Antioxidantes e Marcadores de Dano Oxidativo em Sangue Humano: principais métodos analíticos para sua determinação.** *Quimica Nova*, v. 30. n. 5. p. 1323-1338, 2007

ZIMMER, K. P. et al. **Endocytotic segregation of gliadin peptide 31-49 in enterocytes.** Gut, v. 59, n. 3, p. 300-10, Mar 2010.

## APÊNDICES

### Apêndice 1: Termo de Consentimento Esclarecido utilizado:

#### Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

**Projeto:** Avaliação dos marcadores pró-inflamatórios e de estresse oxidativo e dos índices de dano de DNA em amostras de biópsia de intestino e de sangue periférico de pacientes com Doença Celíaca: relação com os genótipos HLA-DQ2 e DQ8 e a morfologia do epitélio intestinal

#### I - Justificativa e objetivos da pesquisa:

Este estudo consiste em uma avaliação bioquímica e das alterações no material genético (DNA) de cada participante. Estas alterações ocorrem normalmente nas células em níveis bastante baixos, e são apontadas como responsáveis, entre outros efeitos, pelos processos de envelhecimento.

#### II - Procedimentos que serão utilizados:

Será feita uma coleta de 10 ml de sangue periférico com o propósito de avaliar os índices de dano de DNA, o estresse oxidativo e os genes que facilitam no diagnóstico da doença celíaca. Também será utilizada uma pequena alíquota da amostra de biópsia de intestino (solicitada por seu médico para diagnóstico ou acompanhamento da doença).

III - Benefícios que se podem obter e procedimentos alternativos que podem ser vantajosos para os indivíduos estudados:

A realização deste estudo permitirá conhecer se o DNA dos pacientes tem mais alterações do que a média da população, podendo servir estes resultados como base para o entendimento dos efeitos do tratamento sobre o material genético dos pacientes.

Pelo presente Consentimento Pós-Informação, declaro que fui informado de forma clara e detalhada, dos objetivos, da justificativa, dos procedimentos que serei submetido, dos riscos, desconfortos e benefícios do presente Projeto de Pesquisa, assim como dos procedimentos alternativos aos quais poderia ser submetido.

#### Fui igualmente informado:

- Da garantia de receber resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento a qualquer dúvida a cerca dos procedimentos, riscos, benefícios e outros assuntos relacionados com a pesquisa;
- Da liberdade de retirar meu consentimento, a qualquer momento, e deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo a continuação do meu cuidado e tratamento;
- Da segurança de que não serei identificado e que se manterá o caráter confidencial das informações relacionadas com a minha privacidade.

O Pesquisador Responsável por este Projeto de Pesquisa é Sharbel Weidner Mahuf (fone: 88114319).

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_.

Nome e assinatura do Paciente ou Voluntário:

\_\_\_\_\_

Nome e assinatura do Responsável Legal, quando for o caso:

\_\_\_\_\_

Assinatura do Pesquisador Responsável:

\_\_\_\_\_

## Apêndice 2: Certificado de aprovação do projeto do Dr. Sharbel no Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UFSC:

Certificado

Página 1 de 1



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
Pró-Reitoria de Pesquisa e Extensão  
Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos

**CERTIFICADO** N° 2198

O Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEPSH) da Pró-Reitoria de Pesquisa e Extensão da Universidade Federal de Santa Catarina, instituído pela PORTARIA N° 0384 GR 99 de 04 de novembro de 1999, com base nas normas para a constituição e funcionamento do CEPSH, considerando o conteúdo no Regulamento Interno do CEPSH, **CERTIFICA** que os procedimentos que envolvem seres humanos no projeto de pesquisa abaixo especificado estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP.

**APROVADO**

PROCESSO: 2198

PR: 455604

TÍTULO: Avaliação de marcadores pró-inflamatórios e de estresse oxidativo e dos níveis de fator de DNA em amostras de tecido de intestino e de sangue, perfetimento primários com Doença Celíaca, incluído com os protocolos RH, A, DQ2 e TQ8.

AUTOR: Sharbel Weidner Mahf, Sharbel Weidner Mahf

FLORIANÓPOLIS, 21 de Dezembro de 2011

Cetificado do CEPSH UFSC

### Apêndice 3: Certificado de aprovação do projeto do Dr. Sharbel pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Infantil Joana de Gusmão:

Página 1 de 4



Hospital Infantil Joana de Gusmão  
Comitê de Ética em Pesquisa

PARECER 008 - 2012

<b>NOME DO PROJETO:</b> Avaliação de marcadores pró-inflamatórios e do estresse oxidativo e dos índices de dano de DNA em amostras de biópsia de intestino e de sangue periférico de pacientes com Doença Cellaca: relação com os genótipos HLA-DQ2 e DQ8	
<b>PESQUISADOR:</b> Sharbel Weidner Maluf	
<b>ORIENTADOR:</b> Tânia Silvia Fróde	
<b>INSTITUIÇÃO RESPONSÁVEL:</b> HJUG	
<b>DATA DO PARECER:</b> 09/02/2012	<b>REGISTRO NO CEP:</b> 002/2012
<b>GRUPO E ÁREA TEMÁTICA:</b> III 4.01	

DOCUMENTOS SOLICITADOS	SITUAÇÃO
1.FOLHA DE ROSTO	Ok
2.PROJETO DE PESQUISA	Ok
3.CURRICULO DO PESQUISADOR	Ok
4.CARTA DE ENCAMINHAMENTO AO CEP	Ok
5.TERMO DE COMPROMISSO ÉTICO	Ok
6.CONCORDÂNCIA DO SERVIÇO	Ok
7.DECLARAÇÃO ASSINADA PELA DIREÇÃO DO HJUG	Ok
8. SUMARIO DO PROJETO	Ok
9. FÓRMULARIO DE AVALIAÇÃO ECONÔMICO FINANCEIRA	Ok
10. DECLARAÇÃO PARA PUBLICAÇÃO E RELATÓRIO FINAL	Ok

CEP- HJUG - Rua Rui Barbosa, 152,  
Bairro Agrônômica, Florianópolis, Santa Catarina  
Fone: (48) 32519092

Registro aprovado no CONEP, conforme Carta Circular nº 168 CONEP/CNS/MS de 07 de março de 2005 e renovado em 14 de fevereiro de 2008.  
e-mail: [cep@hjug@unifsc.br](mailto:cep@hjug@unifsc.br)

OBJETIVO	
<b>Objetivo geral:</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Avaliar marcadores bioquímicos (de inflamação o estresse oxidativo) e de instabilidade genômica nas células do intestino e do sangue periférico de pacientes com doença celíaca com e sem privação de glúten, comparando com a morfologia do epitélio intestinal e com o genótipo dos genes HLA (presença de DQ2 e/ou DQ8).</li> </ul>
<b>Objetivos específicos:</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Comparar marcadores pró-inflamatórios e de estresse oxidativo no intestino com os avaliados no sangue periférico de pacientes com doença celíaca com e sem privação de glúten;</li> <li>Comparar os resultados obtidos em pacientes com doença celíaca com os controles pareados quanto à idade, sexo e tabagismo (que influencia nos índices de dano de DNA);</li> <li>Extrair DNA do sangue e das células do intestino de pacientes com doença celíaca;</li> <li>Genotipar os pacientes com doença celíaca quanto aos genes HLA-DQ2 e DQ8 e determinar a frequência destes na amostra estudada;</li> <li>Comparar os portadores do gene HLA-DQ2 com os portadores do gene HLA-DQ8, quanto aos parâmetros bioquímicos, de dano de DNA e morfologia do epitélio intestinal;</li> <li>Sugerir alternativas de minimização do estresse oxidativo, se presente no intestino de pacientes celíacos, com objetivo de auxiliar no tratamento (privação de glúten) e prevenção de doenças secundárias, como o câncer.</li> </ul>

SUMÁRIO DO PROJETO
<p>O estudo objetiva avaliar marcadores bioquímicos (de inflamação o estresse oxidativo) e de instabilidade genômica nas células do intestino e do sangue periférico de pacientes com doença celíaca com e sem privação de glúten, comparando com a morfologia do epitélio intestinal e com o genótipo dos genes HLA (presença de DQ2 e/ou DQ8).</p> <p>Estima-se obter uma amostra composta por 60 indivíduos com a doença celíaca diagnosticada e 30 controles atendidos no Serviço de Gastroenterologia do HJUG, durante aproximadamente 8 meses.</p> <p>O cálculo amostral foi realizado através do programa WinPepi, versão 8.0, levando-se em consideração a variação normalmente encontrada nas técnicas que serão aplicadas neste estudo (Técnica do Cometa, Técnica de Micronúcleos, análises bioquímicas), para um nível de significância de 5%. As amostras obtidas (séricas o do tecido) serão coletadas em todos os pacientes com doença</p>

CEP- HJUG - Rua Rui Barbosa, 152  
 Bairro Agrônômica, Florianópolis, Santa Catarina  
 Fone: (48) 33319092

Registro aprovado no CONEP, conforme Carta Circular nº 168 CONEP/CNS/MS de 07 de março de 2005 e renovado em 14 de fevereiro de 2008.  
 e-mail: cephijug@saudefsc.gov.br

celíaca. Aqueles que não aceitarem participar serão excluídos do estudo. As amostras serão armazenadas em freezer a -80C no laboratório de pesquisa em Imunologia (Bloco H, segundo andar, CCS).

Para as avaliações do tecido intestinal, serão utilizadas sobras de material das biópsias realizadas para diagnóstico e acompanhamento dos pacientes, não havendo a necessidade de biópsias exclusivas para a pesquisa. Nestas amostras, serão aplicadas as análises bioquímicas e a técnica do cometa (índices de dano de DNA).

As coletas de sangue serão feitas através de punção intravenosa com agulhas e seringas estéreis e descartáveis. De cada paciente serão coletados 4ml de sangue periférico em tubo heparinizado (para avaliação de dano de DNA e marcadores de estresse oxidativo) e 4ml em EDTA (para análise molecular). O processamento e análise dos parâmetros bioquímicos e de dano de DNA, bem como a extração de DNA das amostras, serão realizados no Departamento de Análises Clínicas da Universidade Federal de Santa Catarina.

Os dados serão analisados no programa SPSS, versão 15.0, utilizando-se análise de anova para comparações entre os grupos dos índices encontrados e correlações de Spearman ou Person, dependendo da distribuição dos resultados, para relacionar os dados avaliados com outros valores.

#### JUSTIFICATIVA

O estudo se justifica para a aquisição de novas informações relevantes sobre o processo inflamatório presente na Doença Celíaca, que possam fundamentar a tomada de medidas para prevenção de doenças secundárias à ela, como o desenvolvimento de neoplasias. O proponente tem seus estudos prévios focados em instabilidade genômica provocada por agentes mutagênicos ambientais ou fármacos (tratamento de doenças) e pretende estender seus estudos para os processos inflamatórios, com ênfase na prevenção do câncer.

#### METODOLOGIA

- 1.DELINEAMENTO – estudo transversal observacional analítico
- 2.CÁLCULO E TAMANHO DA AMOSTRA – 60 indivíduos – programa WinPepi, versão 8.0
- 3.PARTICIPANTES DE GRUPOS ESPECIAIS – sim
4. RECRUTAMENTO – através da ACELBRAS-SC
- 5.CRITÉRIOS DE INCLUSÃO / EXCLUSÃO – os que aceitarem participar do estudo

CEP- HUG- Rua Rui Barbosa, 152  
Bairro Agronômica, Florianópolis, Santa Catarina  
Fone: (48) 32519092

Registro aprovado no CONEP, conforme Carta Circular nº 168 CONEP/CNS/MS de 07 de março de 2005 e renovado em 14 de fevereiro de 2008.  
e-mail: cep hug@saude.sc.gov.br

- 6.PONDERAÇÃO ENTRE RISCOS – BENEFÍCIOS – sim
- 7.USO DE PLACEBO OU WASH-OUT – não se aplica
- 8.MONITORAMENTO E SEGURANÇA DOS DADOS – adequado
- 9.AVALIAÇÃO DOS DADOS – programa SPSS, versão 15.0, utilizando-se análise de anova para comparações entre os grupos dos índices encontrados e correlações de Sperman ou Person
- 10.PRIVACIDADE E CONFIDENCIALIDADE – adequado
- 11.PREOCUPAÇÃO COM OS ASPECTOS ÉTICOS - sim
- 12.CRONOGRAMA – adequado
- 13. PROTOCOLO DE PESQUISA – adequado
- 14.ORÇAMENTO – adequado

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO (TCLE) – adequado

PARECER FINAL

APROVADO

- Informamos que o presente parecer foi analisado e aprovado em reunião deste comitê, na data de 09.02.2012
- Conforme Resolução 196/92, capítulo III.2.h, o pesquisador deve apresentar ao CEP relatórios periódicos sobre o andamento da pesquisa e relatório final. No site: <http://www.saude.sc.gov.br/hijg/cep/deveresdoesquisador.htm>, está disponibilizado modelo. Seu primeiro relatório está previsto para AGOSTO, ou para quando da finalização da mesma.
- Qualquer alteração a este projeto de pesquisa aprovado deverá ser comunicada ao CEP-HIJG.



VANESSA BORGES PLATT  
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisas - HIJG.

CEP- HIJG - Rua Rui Barbosa, 152  
Bairro Agronômica, Florianópolis, Santa Catarina  
Fone: (48) 32519092  
Registro aprovado no CONEP, conforme Carta Circular nº 168 CONEP/CNS/MS de 07 de março de 2005 e  
renovado em 14 de fevereiro de 2008.  
e-mail: [cephijg@saude.sc.gov.br](mailto:cephijg@saude.sc.gov.br)